



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 24 953 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
A 61 K 45/00
A 61 K 31/47

⑳ Aktenzeichen: 101 24 953.5
㉔ Anmeldetag: 21. 5. 2001
㉕ Offenlegungstag: 12. 12. 2002

DE 101 24 953 A 1

㉚ Anmelder:
Knipper, Marlies, Dr., 72076 Tübingen, DE

㉛ Vertreter:
Rudolph, U., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 69198
Schriesheim

㉜ Erfinder:
gleich Anmelder

㉞ Entgegenhaltungen:

DE	100 05 302 A1
WO	00 73 283 A1
WO	00 05 232 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉟ Substanz für die therapeutische Behandlung von Tinnitus

㊱ Die Erfindung betrifft Substanzen, die die Transkription der Exone III und IV des BDNF-Gens (Synonym: BDNF Exon III/IV) stimulieren, als Wirkstoff(e) von Arzneimitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen für die therapeutische Behandlung von Tinnitus.

DE 101 24 953 A 1

[0001] Die Erfindung betrifft eine Substanz als Wirkstoff von Arzneimitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen für die therapeutische Behandlung von Tinnitus.

[0002] Zwischen 6% und 8% der Bevölkerung in der USA, England oder Deutschland leidet unter Phantom-Geräusch-Wahrnehmungen, dem sogenannten Tinnitus. Zur Zeit wird Tinnitus mit psychosomatischer Behandlung, Relaxations Therapie, Biofeedback, Hypnotherapie, elektrischer Stimulation, Lidocain Iontophorese oder Maskierung therapiert, ein ausschließlich symptomatisches Therapiekonzept. Eine ursächlich angreifende Therapie fehlt bis heute völlig. Auf der Basis der Erkenntnis, daß Tinnitus im Menschen durch Salicylatgaben induziert werden kann, daß beim Tier Salicylatgaben eine Hyperaktivität zentraler auditorischer Kerngebiete hervorrufen und ganz in Analogie zum Menschen, Phantomgeräuschwahrnehmungen auslösen, ist ein Tiermodell entwickelt worden (Penner and Jastreboff, 1996, Bauer et al., 1999), bei dem ein Salicylat-induzierter Tinnitus durch Konditionierung eine Verhaltensänderung im Tier hervorruft (Penner and Jastreboff, 1996; Bauer et al., 1999).

[0003] Im dem Stand der Technik ist bekannt, daß Nervenwachstumsfaktoren nicht nur generelle Überlebensfaktoren für Nervenzellen sind, sondern eine akute Stimulierung der elektrischen Aktivität von Nervenzellen induzieren können und diese auf die Aktivität von Neuronen zurückwirken kann (Thoenen, 1995).

[0004] Zur Familie der Nervenwachstumsfaktoren gehört unter anderem das Protein BDNF (brain-derived nerve growth factor), das mit hoher Affinität einen Proto-Oncogen-, Rezeptor, den Tyrosin Kinase Rezeptor (TrkB), bindet. Es ist insbesondere das BDNF-Protein, das über die Aktivierung unterschiedlicher Promotoren auf die Effizienz und den Erhalt von Synapsen und Neuronen zurückwirkt und so unter anderem auch den Phänotyp von distinkten Neuronen aufrechterhalten kann (Rutherford et al., 1997). Das BDNF-Gen besteht aus vier 5' Exonen (Exon I bis Exon IV), die an separate Promotoren gekoppelt sind, und aus einem gemeinsamen 3' Exon (full-length BDNF), das für das reife BDNF-Protein kodiert (Timmusk et al., 1993).

[0005] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist die Bereitstellung von Arzneimitteln zur therapeutischen Behandlung von Tinnitus, die auf die molekularen Ursachen von Tinnitus ausgerichtet sind und deshalb die bisher bekannten Behandlungsverfahren hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirkung übertreffen und ergänzen.

[0006] Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung von Substanzen der eingangs genannten Art, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie die Transkription der Exone III und IV des BDNF-Gens (Synonym: BDNF Exon III/IV) stimulieren und demzufolge für den Einsatz als Wirkstoff(e) von Arzneimitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen für die therapeutische Behandlung von Tinnitus geeignet sind.

[0007] Diese erfindungsgemäße Lösung beruht auf der überraschenden Erkenntnis, daß die im Säugetier und Mensch durch Salicylatgaben induzierten Tinnitussymptome mit einer signifikanten Reduktion der BDNF Exon III- und BDNF Exon IV-Aktivität im peripheren auditorischen System einhergehen, nämlich mit einer Erniedrigung der BDNF Exon III/IV-mRNA-Konzentration im Innenohr und im Inferioren Colliculus, und daß durch eine Stimulierung der BDNF Exon III/IV Aktivität, d. h. durch eine Erhöhung der BDNF Exon III/IV-mRNA-Konzentration die Tinnitus-Symptome beseitigt oder zumindest verringert werden können.

[0008] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die BDNF Exon III/IV stimulierende Substanz ein Analogon von BDNF Exon III- und/oder BDNF Exon IV-Transkriptionsfaktoren oder deren Regulatoren. Ebensogut kann die Substanz aber auch ein AMPA-Glutamat-Transmitter-Rezeptor-Agonist sein, insbesondere ein Kainate-Derivat, oder auch ein NMDA-Glutamat-Rezeptor-Agonist, insbesondere Quinolin Säure-Derivate und/oder Derivate von L-trans-2,3-PDC.

[0009] Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die BDNF Exon III/IV regulierende Substanz ein Aktivator der Transmitter-Rezeptor-medierten Signaltransduktionskaskade, die im menschlichen Innenohr und/oder in peripheren zentralen auditorischen Projektionen die Genaktivität der BDNF Exone III und IV reguliert. Als solche Aktivatoren kommen erfindungsgemäß vor allem Regulatoren von Immediately Early Genen (WO) wie z. B. Agonisten spannungsabhängiger Ca²⁺ Kanäle, insbesondere Bay K 8644-Derivate, und Agonisten des CREB-Signaltransduktionsweges, insbesondere Forskolin-Derivate, zum Einsatz.

[0010] Sämtlich vorstehen genannten BDNF Exon III/IV-stimulierenden Substanzen sind als Ausgangsmaterialien bzw. Wirkstoffe von Therapeutika zur langfristigen und/oder akuten Behandlung von Tinnitus geeignet. Die vorliegende Erfindung umfaßt daher auch die Verwendung dieser erfindungsgemäßen Substanzen – allein oder in Kombination – zur Herstellung von Arzneimitteln bzw. pharmazeutischen Zubereitungen für die therapeutische Behandlung von Tinnitus.

[0011] Da es bisher keine befriedigend wirksame ursächlich angreifende Therapie für Tinnitus gibt, und die Folgekosten von nicht-therapiertem Tinnitus – durch psychosomatische Behandlungen, Arbeitsunfähigkeit bis hin zum Suizid – ein immenses gesellschaftspolitisches Problem darstellen, liefert die vorliegende Erfindung mit der Möglichkeit der Bereitstellung solcher Arzneimitteln/pharmazeutischen Zubereitungen einen Lösungsweg auch für dieses Problem.

[0012] Eine bevorzugte Verwendungsvariante sieht die Herstellung solcher Arzneimittel bzw. pharmazeutischen Zubereitungen vor, die den Patienten mittels des von Lehner et al. 1996 beschriebenen Mikrodosiersystem verabreicht werden können. Dieses Mikrodosiersystem ist zur langfristigen Applikation der erfindungsgemäßen BDNF Exon III/IV stimulierenden Substanzen geeignet.

[0013] Eine anderen Ausführungsvariante besteht darin, daß die unter Verwendung der erfindungsgemäßen Substanzen hergestellten Arzneimittel bzw. pharmazeutischen Zubereitungen virale Expressionssysteme (virale Genkonstrukte) der Humanmedizin sind, die dazu geeignet sind, einen stabilen Gentransfer von Substanzenanaloga ins Innenohr oder ins zentrale Nervensystem zu realisieren (Garrido et al. 1996).

[0014] Die Erfindung wird im folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert.

Beispiel 1

Korrelation der BDNF Exon III/IV-mRNA-Konzentration mit Tinnitussymptomen

[0015] Die Untersuchungen wurden am Tiermodell gemäß Penner und Jastreboff (1996) und Bauer et al. (1999) durchgeführt.

[0016] Ratten (Wistar) wurden von Charles River bezogen. Adulte Ratten (1–3 Monate) wurden in folgende Gruppen aufgeteilt. Eine Kontrollgruppe (I) von Tieren blieb unbehandelt. Eine Testgruppe (II) wurde entsprechend dem Stand der Technik (siehe Bauer et al., 1999) für 3 Monate über das Trinkwasser mit Salicylat behandelt. Eine Testgruppe (III) wurde mit Salicylat und darüberhinaus über eine Mittelohr Drainage (Katheter) lokal mit niedrigsten Dosen von AMPA-Rezeptor Agonist Kainate (0,1 nanomolar, 1 Bolus, 1 × täglich) behandelt. Eine Testgruppe (IV) wurde mit Salicylat und darüber über eine lokale Applikation mit NMDA Rezeptor Agonist Quinolin- Säure (0,1 nanomolar, 1 Bolus, 1 × täglich) behandelt. Eine Testgruppe (V) wurde mit Salicylat und darüber hinaus über eine lokale Applikation mit L-Typ Ca²⁺ Kanal Agonist Bay-K-8644 (0,1 µ-molar, 1 Bolus, 1 × täglich) behandelt. Die Tiere wurden nach der Salicylatbehandlung zum Zweck der Organentnahme getötet.

(II) Methode

(A) Hörmessungen

[0017] Klick-evozierte und frequenzabhängige Stammhirn-Potential-Messungen wurden gemäß Knipper et al., 2000 durchgeführt. Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAEs) wurden wie bei Knipper et al., 2000 beschrieben durchgeführt.

(B) Gewebe Präparation

[0018] Die Präparation der Cochlea und des Colliculus Inferior erfolgte gemäß den im Stand der Technik bekannten Methoden (Knipper et al., 2000). Die zentralen auditorischen Kerngebiete bzw. die Cochleae wurden mittels der im Stand der Technik (Knipper et al. 2000) bekannten Verfahren isoliert und dessektiert. Die Cochleae wurden in 0,1 molar EDTA oder Calcein (Fisher Diagnostic, Fair Lawn, NJ, USA) zum entkalken inkubiert und abschließend in O. C. T. Compound (Miles Laboratories, Elkhart, Ind., USA) eingebettet.

(C) Riboprobe Synthese

[0019] Von im Handel erhältlichen (z. B. Firma Regeneron, USA), in pBluescript II SK(–) Vektoren klonierte Voll-längensequenzen (Full-length Sequenzen) der Tyrosinkinase Rezeptoren trkB (Rezeptor für BDNF), (pSK-rTrkB(C1), 3,3 kb) und BDNF (pSK-rB(C1), 1,1 kb) wurden komplementäre Sense und Antisense Stränge mit den im Stand der Technik bekannten und geläufigen Methoden in vitro transkribiert (Wiechers et al., 1999). BDNF-Exon I-IV cDNAs wurden auf fachübliche Weise kloniert und zur Verifizierung sequenziert. Riboprobe wurden mit im Stand der Technik bekannten Methoden in vitro transkribiert (Timusk et al., 1993).

(D) In-situ-Hybridisierung

[0020] Die Riboprobe wurden in entsprechenden Konzentrationen im Hybridisierungspuffer verdünnt (RPN3310, Amersham). Die Hybridisierung mit mRNA auf Cochlea- und Inferior-Colliculus-Schnitten erfolgte über Nacht in einer 50%-Formamid-haltigen Feuchtekammer bei 5°C. Die Wasch- und Detektionsprozedur erfolgte wie bei Gestwa et al., 1999 beschrieben.

[0021] Die Detektion von BDNF-, Exon I-V- und trkB-mRNA im Northern Blot erfolgte mit den im Stand der Technik bekannten Methoden (Knipper et al., 1998; Wiechers et al., 1999; Gestwa et al., 1999).

(F) Verhaltenskonditionierung

[0022] Ratten werden in Analogie zu Penner und Jastreboff, 1996 und Bauer et al. 1999 so konditioniert, daß sich eine Salicylat-induzierte Phantomgeräusch-wahrnehmung in einer messbaren Verhaltensänderung demonstrieren läßt. Käfig- und Versuchsaufbau sind in Analogie zu Penner und Jastreboff, 1996 und Bauer et al. 1999 durchgeführt. 10 Ratten werden über 10 Trainingseinheiten in täglich 20 Minuten Trainingssitzungen konditioniert, so dass sie einen 70 dB/3 kHz Ton mit Zuckerwasserbelohnung koppeln. Der Ton wird in Grenzen und Breitbandigkeit variiert. Bei Stille verbringen die Tiere typischerweise nach ca. 10 Konditionierungs – Sitzungen keine sinnlose Zeit mehr am Belohnungssponder. Bei Bedarf wird Fehlverhalten mit negativem Stimulus (Strompuls) bestraft.

[0023] Salicylat-induzierter Tinnitus im Tier resultiert in einer meßbaren Verweildauer am Belohnungssponder.

(III) Ergebnisse

[0024] Die Untersuchung der Hörfähigkeit der Tiere mit Hilfe der Klick- und frequenzabhängigen BERA und mit Hilfe von DPOAE Messungen jeweils vor und nach der Salicylat-Behandlung zeigten (in Übereinstimmung mit Kujawa et al., 1992), daß eine kurzfristige Salicylat Behandlung die Hörschwelle nicht meßbar verändert, die Distorsionsprodukte otoakustischer Emissionen (DPOAE) jedoch signifikant reduziert. Nach chronischen Salicylatgaben war mit der Klick-induzierten Stammhirn-Potential-Messung und mit der frequenzabhängigen Stammhirn-Potential-Ableitung ein geringer aber dennoch signifikanter Hörschwellenverlust im hochfrequenten Bereich nachweisbar, der (in Analogie zu Bauer et al. 1999) mit einer konditionierten Verhaltensänderung des Tieres korrelierte.

[0025] Die molekulare Analyse der Konzentration von BDNF-Exon I- bis V-mRNA sowie trkB-mRNA in der Cochlea und im Inferioren Colliculus mittels in situ Hybridisierung und Northern Blot Technik zeigte, daß der BDNF Exon III- und IV-mRNA-Spiegel sowohl in den Spiralganglien der Cochlea als auch im gesamten Inferioren Colliculus (Northern Blot) und im zentralen, dorsalen und externen Nukleus des Inferioren Colliculus (In Situ Hybridisierung) nach chronischer Salicylat-Applikation im Vergleich zur Kontrolle signifikant niedriger war.

[0026] Die gleichzeitige Applikation von Salicylat und Quinolin Säure bzw. Salicylat und Kainate bzw. Salicylat und Bay K 8644 resultierte sowohl in der Cochlea als auch im Inferioren Colliculus in BDNF-Exon-III/IV-mRNA Spiegeln, die mit denen der unbehandelten Kontrolltiere vergleichbar waren. Damit einher ging eine Normalisierung des hochfrequenten Hörverlustes bei den betroffenen Tieren.

Literaturzitate

Bauer, C. A., Brozoski, T. J., Rojas, R., Boley, J. B., Wyder, M. (1999) A behavioural model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 121, 457–462.
 Garrido, J. J., Alonso, M. T., Lim, F., Represa, J., Giraldez, F. and Schimmang, T. (1996) Using herpes simplex virus

type 1 (HSV-1) mediated gene transfer to study neurotrophins in cochlear neurons. *Int. J. Dev. Biol.*, 1, 149S–150S.

Gestwa, G., Wiechers, B., Praetorius, M., Rohbock, K., Köp-
schall, L., Zenner, H. P. and Knipper, M. (1999) Differential
expression of *trkB*. T1 and *trkB*. T2, truncated *trkC* and
p75NGFR in non-neuronal cells of the cochlea prior to hear-
ing function. *J. Comp. Neurol.* 414, 33–50

Knipper, M., Zinn, C., Praetorius, M., Rohbock, K., Köp-
schall, L., Zenner, H. P., Zimmermann, U. (2000) Thyroid
hormone deficiency before hearing causes irreversible da-
mage to peripheral and central auditory systems. *J. Neuro-
physiol.* (in press).

Kujawa, S. G., Fallon, M., Bobbin, R. P. (1992) Intracoch-
lear salicylate reduces lowintensity acoustic and cochlear
microphonic distortion products. *Hear. Res.* 64, 73–80.

Lehner, R. et al. (1996) A new implantable drug delivery sy-
stem for local therapy of the middle and inner ear. *Ear, Nose
Throat*, 76, 567–570

Penner, M. J., and Jastreboff, P. J. (1996) Tinnitus: Psycho-
physical observations in humans and an animal model. In:
Van De Water, Popper, A. N., Fax, R. R. (Ed) *Clinical
aspects of hearing*. Springer, New York, Heidelberg, pp
208–304.

Rutherford, L. C., DeWan, A., Lauer, H., Turrigiano, G. G.
(1997) BDNF mediates the activity-dependent regulation of
inhibition in neocortical cultures. *J. Neurosci.* 17,
4527–4535.

Thoenen, H. (1995) Neurotrophins and neuronal plasticity.
Science 270, 593–598.

Timmusk, T., Palm, K., Metsis, M., Reintam, T., Paalme, V.,
Saarma, M., Persson, H. (1993) Multiple promoters direct
tissue-specific expression of rat BDNF gene. *Neuron*, 10,
475–489

Wiechers, B., Gestwa, G., Mack, A., Zenner, H. P. and Knip-
per, M. (1999) Changing patterns of BDNF expression cor-
relate with rearrangement of fibres during cochlear.

Patentansprüche

1. Substanz zur Verwendung als Wirkstoff von Arznei-
mitteln/pharmazeutischen Zubereitungen für die thera-
peutische Behandlung von Tinnitus, **dadurch gekenn-
zeichnet**, daß sie die Exone III und IV des BDNF-Gens
stimulieren.
2. Substanz nach Anspruch 1, dadurch gekennzeich-
net, daß sie den BDNF-Exon III-mRNA-Spiegel und/
oder den BDNF-Exon-IV-mRNA-Spiegel erhöht.
3. Substanz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Substanz ein BDNF-Exon III-Trans-
kriptionsfaktor und/oder ein BDNF-Exon IV-Trans-
kriptionsfaktor oder ein Analogon oder eine Regulator
wenigstens einer dieser Transkriptionsfaktoren ist.
4. Substanz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Substanz ein AMPA-Glutamat-Trans-
mitter-Agonist ist.
5. Substanz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeich-
net, daß die Substanz ein Kainate-Derivat ist.
6. Substanz nach Anspruch 4, dadurch gekennzeich-
net, daß die Substanz ein NMDA-Glutamat-Rezeptor-
Agonist ist.
7. Substanz nach Anspruch 6, dadurch gekennzeich-
net, daß die Substanz ein Quinolinsäure-Derivat und/
oder ein Derivat von L-trans-2,3-, PDC ist.
8. Substanz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Substanz ein Aktivator der Transmit-
ter-Rezeptor-medierten Signaltransduktionskaskade
ist.
9. Substanz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeich-

net, daß die Substanz ein Regulatoren von Immediately
Early Genen (IEG) ist.

10. Substanz nach Anspruch 10, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Substanz ein Agonisten spannungsab-
hängiger Ca²⁺ Kanäle, insbesondere ein Bay K 8644-
Derivat ist.

11. Substanz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeich-
net, daß die Substanz ein Agonisten des CREB-Signal-
transduktionsweges, insbesondere ein Forskolin-Der-
ivat ist.

12. Substanz nach einem der Ansprüche 1 bis 11, da-
durch gekennzeichnet, daß sie von einer Nukleotidse-
quenz kodiert wird, die in ein virales Expressionssy-
stem integrierbar ist, das dazu geeignet ist, einen stabi-
len Transfer dieser Nukleotidsequenzen in Zellen des
Innenohrs oder des zentrale Nervensystems und die
Expression der Substanz in diesen Zellen zu realisie-
ren.

13. Verwendung einer Substanz nach einem der An-
sprüche 1 bis 12 zur Herstellung von Arzneimitteln/
pharmazeutischen Zubereitungen für die therapeuti-
sche Behandlung von Tinnitus.